

5) 五條堀 孝 (2012) (発表)「肝炎ウイルス統合データベースの構築およびネットワーク解析」、厚生労働科学研究費補助金 2 班合同会議、KKR ホテル東京 (東京) 1 月 27 日

6) Takashi Gojobori (2012) “Vision from Data-Intensive Life Science: GENOME INFORMATION-ORIENTED SOCIETY“, 座談會, Taipei, R.O.C, 2 月 22 日

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成23年度）

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な
遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

分担研究者：脇田 隆字 国立感染症研究所 ウイルス第二部 部長

分担研究課題：ウイルス因子の解析

研究要旨：本研究の目的は、B型肝炎ウイルス感染に起因する各種の病態形成に関わる宿主（ヒト）因子を網羅的ゲノム解析により同定し、新たな診断法や治療法の開発に寄与することにある。そのためにウイルス側因子も解析する。宿主ゲノム解析をおこなった検体についてウイルスゲノムについて塩基配列および機能解析をおこなう。

A. 研究目的

研究班の目的は、B型肝炎ウイルス感染に起因する各種の病態形成に関わる宿主因子を網羅的ゲノム解析により同定し、新たな診断法や治療法の開発に寄与することにある。そのために患者毎にウイルスゲノムの解析も実施することにより、各種病態形成に関わる宿主遺伝要因間や宿主遺伝要因とウイルス因子間の相互作用も明らかにする。研究班では、1) HBV持続感染、2) HBV関連肝癌、3) HBV再活性化、4) HBV重症化（劇症化）、5) インターフェロン(IFN)などの薬剤への応答性、のそれぞれに関与する遺伝要因を同定する予定である。そこで、本分担研究ではB型肝炎患者群のウイルスを解析する。

B. 研究方法

1. HBV複製細胞

HBV複製細胞としてHep2.2.15細胞およびHepAD38細胞を入手した。

2. HBV感染感受性細胞

HepaRG細胞を入手し、そのHBV感染感受性を検討した。また、初代培養ヒト肝細胞のHBV感染感受性を検討した。

3. HBV感染動物モデル

ヒト肝細胞キメラマウスを作製し、ウイルスの感染感受性を確認した。

（倫理面への配慮）

各種研究材料の取り扱い及び組換えDNA実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成13年3月29日付 12文科振第266号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報を厳格に管理保存する。

C. 研究結果

本年度はHBVの複製増殖細胞、感染感受性細胞および感染動物モデルの基礎検討を実施した。HBV複製細胞としてHep2.2.15細胞およびHepAD38細胞を入手した。HepAD38細胞ではテトラサイクリンのon, offによりHBVの複製増殖をスイッチングが可能となることを確認した。両細胞ともに培養上清にウイルス粒子を分泌していることを抗HBs抗体による免疫沈降後のHBVゲノムのHBVウイルスゲノム検出により確認した。サザンブロットおよびリアルタイムPCRによるウイルスゲノムの検出系、ノザンブロットによるRNAの検出系を構築した。HepaRG細胞は細胞を播種して

から約 2 週間分化させることにより感染感受性を誘導できる。分化した状態で約 10% の細胞に感染を確認した。初代培養ヒト肝細胞に HBV を感染させると接種ウイルス量に依存してウイルス感染を確認した。高ウイルス量の摂取ではほぼ 100% の細胞に感染を確認した。uPA-NOG マウスを実験の末水博士より供与いただいた。凍結ヒト初代培養肝細胞を uPA-NOG マウスに経脾臓的に移植して作製したヒト肝細胞移植 uPA-NOG マウスに HBV を接種したところ持続的な感染が成立した。

D. 考察

HBV を解析するための実験系の構築と確認を実施した。来年度は患者由来のウイルス解析を実施する。

E. 結論

HBV を解析するための HBV 複製細胞、感染感受性細胞、感染動物モデルを構築した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1: Weng L, Kohara M, Wakita T, Shimotohno K, Toyoda T. Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase. *Gene*. 2012 496(2):79-87.
- 2: Murayama A, Kato T, Akazawa D, Sugiyama N, Date T, Masaki T, Nakamoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O, Nomoto A, Wakita T. Production of Infectious Chimeric Hepatitis C Virus Genotype 2b Harboring Minimal Regions of JFH-1. *J Virol*. 2012 86(4):2143-52.
- 3: Salim MT, Aoyama H, Sugita K, Watashi K, Wakita T, Hamasaki T, Okamoto M, Urata Y, Hashimoto Y, Baba M. Potent and selective inhibition of hepatitis C virus replication by novel phenanthridinone derivatives. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 415(4):714-9.
- 4: Sugiyama M, Tanaka Y, Wakita T, Nakanishi M, Mizokami M. Genetic Variation of the IL-28B Promoter Affecting Gene Expression. *PLoS One*. 2011;6(10):e26620.
- 5: Arnaud N, Dabo S, Akazawa D, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Hugon J, Wakita T, Meurs EF.

Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response. *PLoS Pathog*. 2011 7(10):e1002289.

6: Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, Suzuki T. Role of the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles. *J Biol Chem*. 2011 286(43):37264-73.

7: Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Yokosuka O, Watanabe H, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 410(3):404-9.

8: Yamamoto M, Aizaki H, Fukasawa M, Teraoka T, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 2011 92(Pt 9):2082-7.

9: Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Ishii K, Suzuki T, Wakita T. Production and characterization of HCV particles from serum-free culture. *Vaccine*. 2011 29(29-30):4821-8.

10: Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T, Kato T. In vivo adaptation of hepatitis C virus in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology*. 2011 54(2):425-33.

11: Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2011 141(1):128-40,140.e1-2.

12: Aly HH, Oshiumi H, Shime H, Matsumoto M, Wakita T, Shimotohno K, Seya T. Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV). *PLoS One*.

2011;6(6):e21284.

2. 学会発表および講演など

1. 脇田隆字, 「新型シーケンサで展開するウイルスゲノム研究」、ランチョンセミナー、第34回日本分子生物学会年会、パシフィック横浜 (2011, 12.14)
2. 相崎英樹、鈴木哲朗、脇田隆字、HCV感染に伴う宿主細胞の脂質代謝の変化と代謝産物のメタボロミクス解析、第47回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィック、(2011, 6.2-3)、シンポジウム1「ウイルス肝炎・肝臓抑制の分子基盤」
3. 加藤孝宣、政木隆博、脇田隆字、HCV JFH-1キメラ株を用いたNS5a阻害剤の株特異的抗ウイルス活性の評価、第15回日本肝臓学会大会、福岡国際会議場、(2011, 10.20-21)、シンポジウム1「C型肝炎治療の新たな展開」
4. 鈴木哲朗、脇田隆字、HCV JFH-1株のチンパンジー感染実験で得られた適応変異株の機能解析、第15回日本肝臓学会大会、福岡国際会議場、(2011, 10.20-21)、パネルディスカッション4「肝疾患動物モデルとtranslational research」
5. 武田緑、池田正徳、有海康雄、脇田隆字、加藤宜之、2種類のヒト肝細胞株を用いたHCV感染レポーターアッセイ系の開発、第47回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィック、(2011, 6.2-3)、
6. 相崎英樹、多田有希、松本喜弘、後藤耕司、渡士幸一、鈴木亮介、田中純子、鈴木哲朗、岡部信彦、脇田隆字、1999年から2009年における日本のC型急性肝炎の発生状況、第47回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィック、(2011, 6.2-3)
7. 加藤孝宣、村山麻子、政木隆博、相崎英樹、脇田隆字、国内献血検体を用いたC型肝炎ウイルス陽性血漿パネルの作製とウイルス量測定法の評価、第47回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィック、(2011, 6.2-3)
8. 村山麻子、三代俊治、脇田隆字、加藤孝宣。C型肝炎ウイルス粒子の産生効率の良いHuH-7細胞サブクローンの分離と同

定、第15回日本肝臓学会大会、福岡国際会議場、(2011, 10.20-21)

9. T Wakita. Hepatitis C Virus Infection and Replication, annual meeting of Prof. Juei-Low Sung's Research Foundation, Taipei, Taiwan (2011, 8. 6)

10. T Wakita. HCV RNA replication and drug development. The 8th APASL Single Topic Conference Beijing, China (2011, 10. 7)

11. T Wakita. Hepatitis C virus replication in vitro and persistent infection in vivo: mechanistic analysis and antiviral development, Singapore-Japan Forum on Emerging Concepts in Microbiology, National University of Singapore, Singapore (2011 Nov 15-16)

12. T Wakita. Hepatitis C virus replication in vitro and persistent infection in vivo: mechanistic analysis and antiviral development, Challenges to overcome Emerging Infectious Diseases in South-eastern Asia, Siran Kaikan, Kyoto University. Kyoto (2012 Jan 13)

13. T Wakita. Hepatitis C virus replication models and anti-viral development, The 1st International Symposium on Latent TGF-beta Activation Reaction, RIKEN Kobe Inst, Ctr. For Delop Biol, Auditorium, Kobe (2012 Feb 25)

14. Takebe, Y., Uenishi, R., Tani, H., Suzuki, R., Hase, S., Akazawa, D., Takagi, M., Tsuchiura, T., Nagasawa, K., Suzuki, T., Irie, K., Shinya, K., Wakita, T., Matsuura, Y., Patel, A., Small molecules that elicit anti-HCV activity through down-modulation of HCV entry receptors, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

15. N Watanabe, K Futai, H Suga, T Wakita, E2 binding peptide identified by RAPID system inhibited HCV infection, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

16. K Goto, T Kimura, K Watashi, R Suzuki, S Yamagoe, T Miyamura, K Moriya, H Yotsuyanagi, K Koike, T Suzuki, T Wakita, H Aizaki, Identification of novel NS5A-associated proteins in the host-cell membrane fraction and their role in HCV life cycle, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel,

Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

17. R Suzuki, T Suzuki, K Saito, M Matsuda, K Watashi, Y Matsuura, T Wakita, H Aizaki, IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF SIGNAL PEPTIDASE COMPLEX 1 THAT INTERACTS WITH HEPATITIS C VIRUS NS2 PROTEIN AND IS INVOLVED IN THE VIRAL ASSEMBLY, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

18. J Law, D Hockman, S Frey, R Khoshy, T Wakita, J Bukh, C Rice, M Houghton, Does a vaccine derived from a single HCV strain elicit broadly cross-neutralising antibodies in humans?, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

19. Y Okamoto, T Masaki, A Murayama, T Wakita, T Kato, Development of chimeric hepatitis C virus expressing NS5A from strains of genotypes 1 and 2: virus production and susceptibility to NS5A inhibitor, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

20. M Fukasawa, Y Shirasago, K Saito, Y Murakami, H Fukazawa, T Suzuki, R Suzuki, T Wakita, K Hanada, J Chiba, Isolation of a highly infectious hepatitis C virus with adaptive mutations, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

21. H Yokokawa, D Akazawa, M Moriyama, N Nakamura, T Kato, K Ishii, T Wakita, Development of purification method for HCV particles using chromatographic technique, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

22. M Esumi, S Kikuta, H Yamaguchi, S Nakajima, M Ishibashi, T Wakita, Serum and trypsin inhibitors inhibit the early step of hepatitis C virus infection, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

23. M Moriyama, D Akazawa, H Yokokawa, K Nishimura, N Nakamura, H Mochizuki, T Kato, K Ishii, T Wakita, Immunological memory

response to induce neutralizing immunoglobulin in HCV particles-immunized mice, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

24. K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita, Identification of small molecules affecting late steps of hepatitis C virus life cycle, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

25. N Uchida, K Watashi, R Suzuki, H Aizaki, J Chiba, T Wakita, Halopemide inhibited a post-assembly step in hepatitis C virus life cycle, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

26. N Watanabe, A Murayama, M Saeed, T Date, T Kato, H Aizaki, T Wakita, Identification and analysis of envelope N-glycans required for HCV lifecycle, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)

27. Y Okamoto, T Masaki, A Murayama, A Nomoto, T Wakita, T Kato, Strain Specific Susceptibility to The Hepatitis C Virus NS5A Inhibitor, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)

28. R Suzuki, K Saito, M Matsuda, K Watashi, Y Matsuura, T Wakita, T Suzuki, H Aizaki, Identification of a host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and is involved in the viral assembly, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)

29. A Murayama, N Sugiyama, S Yoshimura, M Ishihara-Sugano, T Wakita, T Kato, Efficient HCV production system using HuH-7 subclone with high virus assembly efficiency, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)

30. H Aizaki, Y Matsumoto, K Goto, K Watashi, R Suzuki, M Fukasawa, K Hanada, S Sato, N Takahashi, Y Matsuura, K Motojima, T Miyamura, T Suzuki, T Wakita, Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production, XV International Congress of Virology. Sapporo

Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)

31. Y Matsumoto, K Watashi, R Suzuki, T Matsuura, T Suzuki, T Miyamura, K Wake, T Wakita, H Aizaki, Antiviral activity of glycyrrhizic acid against hepatitis C virus in vitro, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)

32. K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita, Identification of small molecules affecting late steps of hepatitis C virus life cycle, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)

33. K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki,

T Wakita, Screening of small molecules affecting the production of hepatitis B virus, 2011 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Oct 9-12, Holliday Inn Walt Disney World Resort, FL USA

G.知的所有権の出願・登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成23年度）

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な
遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

分担研究者：八橋 弘 国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター
治療研究部 部長
研究協力者：斐 成寛 国立病院機構長崎医療センター 肝臓内科
長岡 進矢 国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター
肝炎治療研究室長
阿比留正剛 国立病院機構長崎医療センター 肝臓内科医長

分担研究課題：HBe抗原陽性B型慢性肝炎患者の肝発癌に寄与する因子の検討

研究要旨：過去15年間の当院におけるHBe抗原陽性B型慢性肝炎患者のデータを後ろ向き解析し、B型慢性肝炎の自然経過における肝発癌因子を検討するとともに、HBeAgセロコンバージョン(HBeAgSC)確認時期と肝発癌との関係を検討した。AFP値 ≥ 15 (ng/ml)、年齢 ≥ 45 才以上の2因子が肝発癌に寄与する独立因子であった。またHBeAgSC時年齢が若年（30歳以下）の群では観察期間内肝発癌例は見られなかったが、SC時年齢45歳以上の群では発癌リスクが有意に上昇していた。

A. 研究目的

HBe抗原陽性B型慢性肝炎の自然経過における発癌因子を検討する。

B. 研究方法

対象は1991年から2005年までに長崎医療センターで初回肝生検を施行し、6ヵ月以上自然経過をフォローし得たHBeAg陽性B型慢性肝炎190例；年齢中央値36(12-74才)、男性/女性:133/57例、genotype B/C:1/189例、肝線維化F1/2/3/4:15/60/44/26/45例、血小板中央値18.5(4.3-33.8万/mm³)、ALT中央値121(13-2200 IU/L)、AFP中央値7.0(0-97 ng/ml)、HBV DNA量中央値7.6(3.6 -8.9 log copies/mL)、コアプロモーター変異 野生型/混合型/変異型:48/43/99例である。肝生検時上記データにて、その後の発癌に寄与する因子をCox比例回帰分析、Kaplan-Meyer法、Logrank test、にて検討した。観察期間中央値は5.5(0.6-20.0年)であり、途中から核酸アナログが投与された群(78/190例)は投与開始時点で観察打ち切りとした。

(倫理面への配慮)

本研究は、後ろ向き観察研究であり、患者の個人情報への扱いについては連結可能匿名化をおこなうなど十分な配慮のもとで解析をおこなった。

C. 研究結果

190例中観察期間内の発癌11例で、累積発癌率は5/10/15/20年:2.6/7.5/12.7/27.2%であった。またCox比例回帰分析で、発癌に寄与する因子は、AFP > 15 (ng/ml) (HR:8.29、 $p=0.01$)、年齢 ≥ 45 才(HR:4.62、 $p=0.041$)の2因子であった。

AFP値 > 15 (ng/ml)($n=70$)の累積発癌率は5/10/15/20年:7.2/20.3/37.4/37.4%、AFP値 < 15 (ng/ml)($n=120$)は5/10/15/20年:0/0/0/21.9%であった($p<0.001$)。また、年齢 ≥ 45 歳($n=49$)の累積発癌率は5/10/15/20年:6.8/26.0/44.5/44.5%、年齢 < 45 歳($n=141$)は5/10/15/20年:1.2/2.7/6.4/22.4%であった($p<0.001$)。

2因子を同時に満たした群($n=26$)において、累積発癌率は5/10/15年:12.0/39.5/

100%と有意に他群より高かった。

観察期間中にHBeAgSCの確認ができた106例を対象としてHBeAgSC時の年齢30歳以下(n=35)・31-45才(n=47)・45歳以上(n=24)の3群に層別化すると、各群での15年累積発癌率は0/23.4/57.5%であり、45歳以上の群において有意に発癌率が高かった。

D. 考察

2010年、Liawらは、HBeAgSC時年齢とその予後の関連性を報告している。即ち、HBeAgSCが30歳未満の場合には予後良好だが、40歳以後では有意にHBeAg陰性慢性肝炎・肝硬変・肝癌の発生率が高いと報告している。今回我々の検討でも、発癌に寄与する因子として初診時年齢が抽出された。さらに、HBeAgSCの確認ができた対象群で、HBeAgSC時の年齢で層別化して肝発癌についての解析をおこなったがLiawらの報告と同様に、HBeAgSC時年齢が発癌の予測因子となり得る事が示唆された。30歳以下でHBeAgSCする群と45歳以上でHBeAgSCする群の間には、ゲノムも含む宿主因子として如何なる違いがあるのか、今後検討をおこなう余地があると考えられた。

E. 結論

HBeAg陽性B型慢性肝炎の自然経過では、AFP値>15(ng/ml)、年齢≥45才以上が発癌肝発癌に寄与する独立因子であった。またHBeAgSC時年齢が若年(30歳以下)の群では観察期間内肝発癌例は見られなかったが、SC時年齢45歳以上の群では発癌リスクが有意に上昇していた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tamada Y, Yatsushashi H, Masaki N, Nakamuta M, Mita E, Komatsu T, Watanabe Y, Muro T, Shimada M, Hijioka T, Satoh T, Mano Y, Komeda T, Takahashi M, Kohno H, Ota H,

Hayashi S, Miyakawa Y, Abiru S, Ishibashi H. Hepatitis B virus strains of subgenotype A2 with an identical sequence spreading rapidly from the capital region to all over Japan in patients with acute hepatitis B. Gut. 2011 Nov 7. [Epub ahead of print]

2) 八橋 弘, 長岡進矢, 阿比留正剛. B型肝炎に対するIFN治療. 総合臨床 60(1):81-6, 2011.1.1.

3) 八橋 弘, 長岡進矢, 玉田陽子. B型急性肝炎の動向と診断・治療. 日本臨床 69(増4): 440-5, 2011.5.20.

4) 八橋 弘. 感染に由来するヒトの腫瘍-その現状と対策, B型肝炎ウイルスと肝細胞癌. 臨床と微生物 38(3): 27-33, 2011.5.25.

5) 八橋 弘, 長岡進矢. ウイルス肝炎・治療/どのように実際の治療をすすめるか, HBワクチンの今後ー現状と将来ー. Medical Practice 28(8): 1449-52, 2011.8.1.

2. 学会発表

1) APASL2012 Single Topic Conference (Jeju, Korea)

“The risk factors of HCC development and age specific prognosis following HBeAg seroconversion in the patients with chronic hepatitis B” Bae SK, Yatsushashi H, et al.

(研究会)

1) 九州B型肝炎フォーラム

「HBe抗原陽性B型慢性肝炎自然経過での肝発癌因子の検討」
 斐成寛 八橋弘 他

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成23年度）

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な
遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

分担研究者：松本 晶博 信州大学医学部附属院消化器内科 特任研究員
研究協力者：田中 榮司 信州大学医学部附属院消化器内科 教授、

分担研究課題：連続変数型遺伝子関連解析法の開発とそれを用いた B 型肝炎ウイルス
遺伝子の機能性変異部位の同定

研究要旨：これまで行われている genome wide association analysis で用いられているカイ2乗
検定をベースにした方法では解析することができなかった遺伝子進化距離とウイルス遺
伝子変異の関係を新たに開発した連続変数型遺伝子関連解析法を用いて、各々の遺伝子変
異を進化的な変異と、個体の中で変異する機能的な遺伝子変異に分類した。これらの変異
について20年間経過観察し得た70例の慢性B型肝炎例の経過観察前後の全塩基配列を比較
することにより解析結果の証明を行った。

A. 研究目的

これまでの遺伝子変異解析法はカイ2乗
検定をベースに開発されているため、遺伝
子距離のような連続変数と遺伝子変異の関
係を解析することができなかった。今回
我々は「連続変数型遺伝子関連解析法」を
新たに開発し、B型肝炎ウイルスにおける
各々の遺伝子変異を進化的な遺伝子変異と
個体の中で変化する機能的な遺伝子変異と
にわけ、約20年間経過観察しえたB型肝炎ウ
イルスキャリアーについて、観察期間前後
の全遺伝子配列を比較することにより、機
能的な遺伝子変異を同定することを試みた。

B. 研究方法

1. 「連続変数型遺伝子関連解析法」の開発

各遺伝子座について、4つの塩基の分布に
よるランダム度を下記の式により求める。

A:塩基Aの個数、G:塩基Gの個数

T:塩基Tの個数、C:塩基Cの個数

N:A+G+T+C

$$(2r-1) + \frac{(1-r) \log R}{4 \log(N/4)! - \log N!}$$

また、Kaiser-Meire-Olkin指数を用いて、目
的とする連続的な従属変数に対する4種類
の塩基の相関適合度を求め、相関係数と掛
け合わせて、その遺伝子座における変異の
従属変数に対する相関係数(r)を求める。
ある遺伝子座における従属変数に対する適
合係数(λ)は、

$$\text{ランダム度}(R) = \frac{(N/4)!^4}{A!G!T!C!}$$

と表され、これは相関係数に準じて扱うこ
とができる。

2. 機能性遺伝子変異の抽出

機能性遺伝子変異を検索するため、HBV
遺伝子型A～Hの71本分をHepatitis virus
DATA serverよりDownloadし、Genetixを用い
てUPGMA法にて系統樹解析を行った。その
結果に従って各strain間の遺伝子距離を木
村の2値法にて求め、最も遠いstrainを元に、
遺伝子間距離行列を作成した。この行列を
従属変数として「連続変数型遺伝子関連解
析法」にて各遺伝子座のHBV進化に対する
適合係数を求めた。

3. 長期経過による遺伝子変異の同定

上記の結果を元に、実際の変異を検証す

るため、20年間の間観察し得た70例の慢性B型肝疾患患者について実際の遺伝子変異を全遺伝子解析により比較検討する。

(倫理面への配慮)

各患者について書面による検体提供の同意を得た。

C. 研究結果

1. B型肝炎ウイルス進化関連遺伝子地図ランダム度および進化距離に対する相関係数より計算した適合係数を各B型肝炎ウイルス座ごとに計算した(図1)。図1グラフの上が進化への関連度である。これによると、PresからSにかけては進化に対する適合度が高く、遺伝子型を決定するのに適していることがわかる。また、nt1762やnt1764のcore promoter変異に関連する部位はマイナスであり、個人の中で変異する現象と一致している。また、nt1896のprecore変異はマイナスだが、遺伝子型間の変異率の違いがあり、中間的な位置にあることが示唆された。その他にもこれまで肝細胞癌関連変異として報告された nt 1479やnt1317なども機能性変異部位として抽出された。現在70例の経過観察例について現在観察期間前後の全塩基配列を決定している。

D. 考察

新たに開発した「連続変数型遺伝子関連解析法」により、進化的な遺伝子変異と機能的な遺伝子変異を抽出することが可能であった。今後、機能的な遺伝子変異が実際に起こっているかどうかを確認し、細胞培養系や、動物モデルを用いて変異と宿主の免疫系との関連を明らかにすることにより新たな治療の目標を検索することができる可能性がある。また、進化距離の代わりにDNA量等を用いればウイルス量の違いをもたらす遺伝子変異を検索することができる可能性がある。

E. 結論

「連続変数型遺伝子関連解析法」により、進化関連遺伝子変異と機能的遺伝子変異を

抽出することが可能であった。この方法は全ゲノム解析時代における遺伝子解析法の有用なツールとなりえる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsumoto A, Tanaka E, Morita S, Yoshizawa K, Umemura T, Joshita S. Changes in the serum level of hepatitis B virus (HBV) surface antigen over the natural course of HBV infection. J Gastroenterol. 2012 (in press)

2) 学会発表

(1) 松本晶博、吉澤要、田中榮司 B型慢性肝炎核酸アナログ薬治療における中止基準についての検討 第15回日本肝臓学会大会 福岡 2011.10

(2) 吉澤 要、城下 智、梅村武司、上條敦、一條哲也、松本晶博、田中榮司 自己免疫性肝炎の病態とサイトカインネットワーク 第47回日本肝臓学会総会 東京 2011.6

(3) 松本晶博、森田進、山田雪、木村岳史、上條敦、城下智、梅村武司、一條哲也、吉澤要、田中榮司 B型肝炎長期経過観察例におけるプレコア・コアプロモーター変異と各種 HBV マーカーとの関係 第47回日本肝臓学会総会 東京 2011.6

(4) 森健一、松本晶博、田中榮司、榎昇 新規変異を有するHCV-TPF1(遺伝子型1b)の培養細胞に対する感染性 第47回日本肝臓学会総会 東京 2011.6

(5) 松本晶博、森田進、田中榮司 B型慢性肝疾患に対する核酸アナログ治療時の耐性株出現および治療中止後の各種マーカーの推移とその臨床的意義 第108回日本内科学会総会 東京 2011.4

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

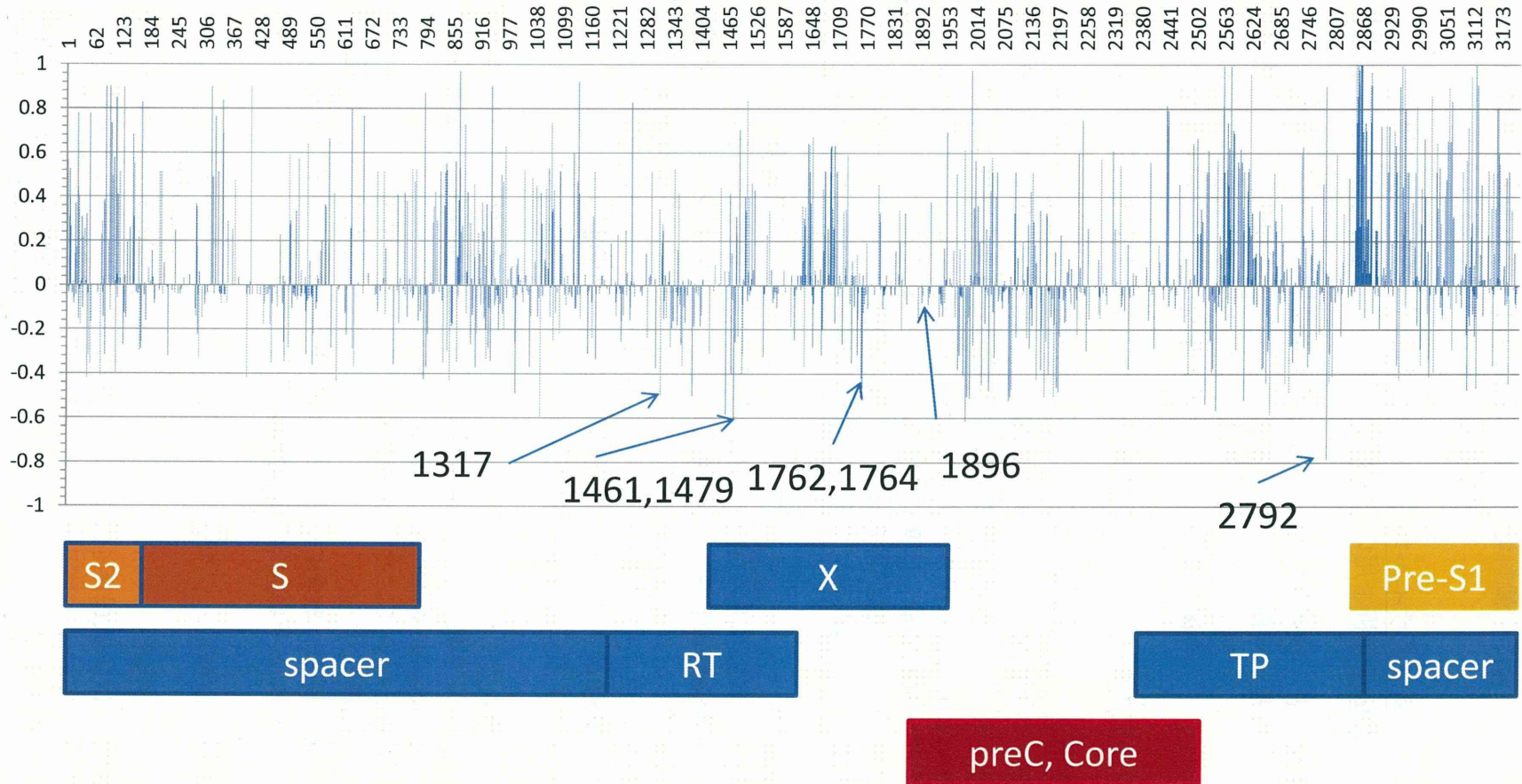
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1.HBVの進化関連遺伝子変異解析



厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成23年度）

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な
遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

分担研究者：横須賀 収 千葉大学大学院腫瘍内科学 教授
研究協力者：神田 達郎 千葉大学大学院医学研究院 腫瘍内科学 特任講師
中本 晋吾 千葉大学大学院医学研究院 分子ウイルス学 助教
今関 文夫 千葉大学大学院医学研究院 腫瘍内科学 准教授

分担研究課題：血中 HBV DNA レベルに及ぼす宿主規定因子の検討

研究要旨：血中 HBV DNA レベルに及ぼす宿主規定因子の検討を明らかにするため B 型肝炎無症候性キャリア、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌患者の血液を採取、収集する。可能であれば本研究班により集められた血液サンプルで Genome-wide association study (GWAS)等を行なうに際しその宿主規定因子を探索検討する。本年度は血液採取、収集に必要なための研究プロトコルを千葉大学生命倫理委員会に申請し、承認が得られた。今後この研究プロトコルに基づき千葉大学医学部附属病院消化器内科にて血液採取、収集を開始する予定である。

A. 研究目的

これまでにHBe抗原の存在やHBV DNA 高値は肝硬変や肝細胞癌発生の独立した危険因子であることが報告されている。しかしこれまでに血中HBV DNAレベルに及ぼす宿主規定因子は不明であり、その宿主因子を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

本研究班により集められた血液サンプルを用いて Genome-wide association study (GWAS)等を行なうに際しその宿主規定因子を探索検討する。本年度は血液採取、収集に必要なための研究プロトコルを千葉大学生命倫理委員会に申請する。次年度以降血液採取、収集を開始する。

(倫理面への配慮)

千葉大学では少数民族を含む人権に十分配慮を行なっている。臨床検体は千葉大学医学部倫理委員会の承諾を得た上で取り扱う。

C. 研究結果

研究プロトコル[研究課題名「B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主遺伝子因子の探索研究」(受付番号308)]を千葉大学生命倫理委員会に申請し平成23年9月12日承認が得られた。

D. 考察

上記研究プロトコルに基づき次年度以降血液採取、収集を開始する。

E. 結論

千葉大学生命倫理委員会に研究プロトコルを申請し平成23年9月12日承認が得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Wu S, Fukai K, Imazeki F, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, Yokosuka O. Initial virological response and viral mutation with adefovir dipivoxil added to ongoing Lamivudine therapy in Lamivudine-resistant chronic hepatitis B. Dig Dis Sci. 2011 Apr;56(4):1207-14.
- (2) Wu S, Imazeki F, Kurbanov F, Fukai K,

Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O. Evolution of hepatitis B genotype C viral quasi-species during hepatitis B e antigen seroconversion. *J Hepatol*. 2011 Jan;54(1):19-25.

(3) Bekku D, Arai M, Imazeki F, Yonemitsu Y, Kanda T, Fujiwara K, Fukai K, Sato K, Itoga S, Nomura F, Yokosuka O. Long-term follow-up of patients with hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011 Jan;26(1):122-8.

(4) Kamezaki H, Kanda T, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Maruyama H, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Emergence of entecavir-resistant mutations in nucleos(t)ide-naive Japanese patients infected with hepatitis B virus: virological breakthrough is also dependent on adherence to medication. *Scand J Gastroenterol*. 2011 Sep;46(9):1111-7.

(5) Wu S, Kanda T, Imazeki F, Nakamoto S, Shirasawa H, Yokosuka O. Nuclear receptor mRNA expression by HBV in human

hepatoblastoma cell lines. *Cancer Lett*. 2011 Dec 15;312(1):33-42.

(6) Togo S, Arai M, Tawada A, Chiba T, Kanda T, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Clinical importance of serum hepatitis B surface antigen levels in chronic hepatitis B. *J Viral Hepatol*. 2011 Oct;18(10):e508-15.

(7) Kanda T, Shinozaki M, Kamezaki H, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Fujiwara K, Goto N, Imazeki F, Yokosuka O. Efficacy of lamivudine or entecavir on acute exacerbation of chronic hepatitis B. *Int J Med Sci*. 2012;9: 27-32.

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成23年度）

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な
遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

分担研究者：持田 智 埼玉医科大学 消化器内科・肝臓内科 教授
研究協力者：中山 伸朗 埼玉医科大学 消・肝内科 講師
菅原 通子 埼玉医科大学 消・肝内科 助教
吉野 廉子 埼玉医科大学 消・肝内科 助教

分担研究課題：B型肝炎ウイルスの生体内における増殖速度を規定する要因の検討

研究要旨：B型慢性肝疾患における核酸アナログの中止に際しては、HBV-DNA、コア関連抗原およびHBs抗原などの定量が有用とされているが、確定した基準は未だない。我々は、治療中にウイルス量低値が持続するものの、中止後に再燃する症例にはgenotype Bが多いことを見出した。そこで、これら再燃例におけるウイルス増殖速度の検討したところ、プレコア変異を伴うGenotype Bおよびプレコア変異とコアプロモーター変異の両者を伴ったgenotype Cで増殖速度が速いことが明らかになった。しかし、これら症例でもウイルスの増殖速度は多彩であり、ウイルスの全塩基配列を解析するとともに、宿主の遺伝子解析も実施して、ウイルス増殖に関わるウイルス側および宿主側の要因の関連を解析することが今後の課題である。

A. 研究目的

HBVは東アジアに蔓延しており、我が国では約150万人のキャリア、約1,000万人の既往感染例が存在する。キャリアは慢性肝炎および肝硬変へと進展し、この過程で肝癌を併発する場合がある。また、キャリアのみならず既往感染例は、免疫抑制・化学療法実施時にHBV再活性化を生じ、重症肝炎を発症するリスクがある。しかし、HBVに対する抗ウイルス療法は核酸アナログの導入によって多大なる進展を遂げた。2000年にlamivudine、2004年にadefovir、更に2006年にはentecavirが保険認可され、現在では3種類の核酸アナログが使用可能となっている。しかし、核酸アナログは治療期間が長期に及ぶに従って、現在までに明らかになっていない新たな耐性変異が出現する可能性がある。また、核酸アナログの効果が良好な症例は、耐性変異を防ぐために治療を中止することが望ましいが、大部分の症例では中止後にウイルス血症が再燃することから、適切な中止基準は未だ確立されてい

ない。

そこで、我々は血清HBV-DNA量、コア関連抗原量が1年以上にわたって検出感度未滿を維持する症例で、核酸アナログを中止した後のウイルス動態を検討することで、その増殖速度を規定するウイルス側の要因を検討した。更に、これら症例の遺伝子解析を行うことで、ウイルス側と宿主側の要因の関連を明らかにすることを目指した。

B. 研究方法

B型慢性肝炎ないし肝硬変で、血清HBV-DNA量が4.0 Log copy/mL以上で核酸アナログ製剤の投与を開始した203例（entecavir 148例、lamivudine 13例、lamivudineとadefovir併用36例、adefovir 5例、tenofovirとadefovir併用1例）。HBe抗体陽性で血清HBV-DNA量2.1 Log IU/mL未滿が1年以上持続した症例でコア関連抗原を8週間隔で測定し、2回連続で検出感度（3.0 Log IU/mL）未滿を示した症例で中止した。

中止後は血清HBV-DNA量を2週ごとに16週間測定し、4.0 Log copy/mL以上になった症例は、ウイルスの塩基配列を解析し、再燃例として核酸アナログ製剤を再開した。

C. 研究結果

203例のうち中止基準を満たしたのは計30例（15%）で、entecavir投与例では24例（16%）であった。中止後の平均観察期間は68±7週で、中止後に再燃の見られなかった症例は9例（30%）で、全例がentecavir投与例であった。再燃した21例のうち16例（76%）はgenotypeがBであった。また、中止成功例と再燃例で年齢、性別、治療開始時のHBV-DNA量、肝機能検査成績および治療反応性（HBV-DNA量検出感度未満に低下するまでの期間）に差異は認められなかった。

再燃例でウイルスの増加速度を見ると、HBV-DNA量が4 Log以上に達するまでの期間は中央値が11週（2~43週）で、4週以内が4例、5~16週が13例、17週以降が4例であった。Genotype Cで再燃した4例が4 Log以上になった時期も4, 9, 17, 43週であり、genotype Bの症例と期間に差異は見られなかった。なお、genotype Bで再燃した症例にはプレコア変異が80%以上の症例が12例（75%）と高率であったが、これに加えてコアプロモーターの変異であった5例は何れも2~10週で再燃しており、ウイルス増殖速度がより速かった。一方、genotype Cの再燃例は何れもプレコアとともにコアプロモーターの変異が認められた。

D. 考察

核酸アナログ投与例のうち、血清HBV-DNAとコア関連抗原量が何れも検出感度未満を継続する症例は約15%と低率であるが、entecavir投与例に限定して、この厳格な中止基準に準拠すると、50%以上の症例で中止に成功した。しかし、lamivudine単独ないしはadefovirとの併用で治療している症例は、中止基準を満たしていても全例が再燃した。なお、再燃例は大部分が

genotype B型でプレコア、コアプロモーター変異が高率に認められることから、このようなウイルス学的背景を有する症例はウイルスの増殖速度が速く、核酸アナログの中止が困難であると考えられた。

そこで、核酸アナログ中止後に再燃した症例を対象にウイルスの増殖速度を比較したところ、genotype Bの感染例でもウイルスの増殖速度は多彩であり、血清HBV-DNA量が4.0 Log copy/mL以上に増加するまでの期間は2~43週であり、症例によって大きくことなることが明らかになった。また、プレコアとともにコアプロモーターの変異の見られる症例はgenotype Cでもウイルス増殖速度が速かった。これらのウイルス変異はウイルスの増殖速度を規定しており、核酸アナログの中止に関わる要因とも推定される。現在、これら症例におけるHBVの全塩基配列を解析して、ウイルス増殖速度との関連を解析中である。また、これら症例を対象に宿主遺伝子の解析も実施し、ウイルス増殖に関わるウイルス側要因と宿主側要因の関連を評価する予定である。

E. 結論

核酸アナログ投与によって、血清HBV-DNA量およびコア関連抗原が検出感度以下の状態が1年以上持続したにも拘わらず、投与中止後にウイルス血症が再燃した症例はプレコア変異を伴うGenotype Bおよびプレコア変異とコアプロモーター変異の両者を伴ったgenotype Cの症例が多かった。しかし、これら症例でもウイルスの増殖速度は多彩であり、ウイルスの全塩基配列を解析するとともに、宿主の遺伝子解析も実施して、ウイルス増殖に関わるウイルス側および宿主側の要因の関連を解析することが今後の課題である。

F. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表

Yoshino K, Sugawara K, Nakayama N, Nagoshi S, Mochida S. Viral factors affecting

the discontinuation of nucleoside analogs therapy in patients with hepatitis B virus. UEGW STOCKHOLM, October, 2011.

吉野廉子, 菅原通子, 中尾将光, 内木佳代子, 稲生実枝, 中山伸朗, 名越澄子, 持田 智. B型慢性肝疾患で核酸アナログ製剤を中止する際の留意点: Genotypeとプレコア, コアプロモーター変異の重要性. 第47回日本肝臓学会総会, 東京, 2011年6月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成23年度）

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な
遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

分担研究者： 小池 和彦 東京大学 教授
研究協力者： 五藤 忠 東京大学医学部附属病院 助教

分担研究課題：肝癌感受性遺伝子の同定

研究要旨：東京大学消化器内科における、この1年間（H22.11月-H23.10月）の肝細胞癌局所治療症例数はのべで795例であった。そのうち、HBV関連肝細胞癌は93例である。うち2例はC型肝炎重複例であり、HCV抗体陰性かつHBsAg陽性例は91例となる。複数回治療例を統合すると、HBV単独陽性の肝細胞癌症例は71人であった。初発例が16例、他院治療後再発の紹介症例（当科初回例）が7例であり、残りは当科経過観察中の再発性であった。当該症例の検体採取を行なった。一方、この1年間（H22.11月-H23.10月）の急性B型肝炎は2例であった。当該症例の検体採取を行なった。今後の検討に資する予定である。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）感染症は世界で最大のウイルス肝炎であり、我が国でもなお100万人を超える持続感染者（キャリア）が存在する。C型肝炎ウイルスとは異なり、HBVは感染個体から現状では排除できないことから、今後も医学・医療・経済上の大きな問題であり続けると推測されている。HBV感染症と肝硬変、肝細胞癌（HCC）などの引き続く合併症を適格に制御するためには、ウイルス側の因子を制御するとともに宿主（患者）側の因子を熟知して対策をたてることが望ましい。B型肝炎関連肝発癌、特に再発に影響を与える感受性遺伝子、肝不全への施行に影響を与える感受性遺伝子等の情報を得ることを目的とする。

B. 研究方法

東京大学消化器内科におけるB型肝炎関連HCC症例をフォローし、HCCの発生時期、部位、治療効果、再発の様式等を詳細に記載してゆく。倫理委員会の承認をえたプロトコールに基づき、患者の同意を取得した後採血を行ない血球の採取、保存を行なう。

（倫理面への配慮）

臨床試験の目的・方法、検査の副作用、患者に関する個人情報等の守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行した（新GCPに遵守）。

C. 研究結果

この1年間（H22.11月-H23.10月）の肝細胞癌局所治療症例数はのべで795例であった。そのうち、HBV関連肝細胞癌は93例である。うち2例はC型肝炎重複例であり、HCV抗体陰性かつHBsAg陽性例は91例となる。複数回治療例を統合すると、HBV単独陽性の肝細胞癌症例は71人であった。初発例が16例、他院治療後再発の紹介症例（当科初回例）が7例であり、残りは当科経過観察中の再発性であった。当該症例の検体採取を行なった。一方、この1年間（H22.11月-H23.10月）の急性B型肝炎は2例であった。当該症例の検体採取を行なった。

D. 考察

新規HCC治療症例は全国的に減少傾向に

あるが、当院におけるHCC治療例は横這い傾向にある。中でB型肝炎関連HCCは当院におけるHCC症例の約15%を占め、数的には横這い状態である。

E. 結論

B型肝炎関連HCC患者の臨床データを蓄積し、血球検体の採取を行なった。今後の研究班における解析に資される予定である。

F. 研究発表

論文発表

- 1)Yoshimi A, Yamamoto G, Goto T, Koike K, Kurokawa M. Hepatocellular carcinoma in cirrhotic liver with graft-versus-host disease. *Ann Hematol* 2012 Feb 9. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22314841.
- 2)Inoue H, Yamazaki S, Shimizu M, Uozaki H, Goto T, Ohnishi S, Koike K. Liver injury induced by the Japanese herbal drug kamishoyosan. *Gastroenterol Hepatol (NY)* 2011;7(10):692-695. PubMed PMID: 22298964.
- 3)Goto E, Masuzaki R, Tateishi R, Kondo Y, Imamura J, Goto T, Ikeda H, Akahane M, Shiina S, Omata M, Yoshida H, Koike K. Value of post-vascular phase (Kupffer imaging) by contrast-enhanced ultrasonography using Sonazoid in the detection of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 2011 Dec 27. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22200940.
- 4)Shiina S, Tateishi R, Arano T, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Asaoka Y, Sato T, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Yoshida H, Omata M, Koike K. Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: 10-year outcome and prognostic factors. *Am J Gastroenterol* 2011 Dec 13. doi: 10.1038/ajg.2011.425. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22158026.
- 5)Ohki T, Tateishi R, Akahane M, Shiina S, Yamashiki N, Mikami S, Enooku K, Goto E, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Inoo S, Ohtomo K, Omata M, Yoshida H, Koike K. Characteristics of hepatocellular carcinoma nodules newly detected by computed tomography during arteriography and arterial portography: preliminary report of a randomized controlled trial. *Hepatol Int* 2011 Aug 31. [Epub ahead of

print] PubMed PMID: 22020826.

- 6)Enooku K, Tateishi R, Kanai F, Kondo Y, Masuzaki R, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. Evaluation of molecular targeted cancer drug by changes in tumor marker doubling times. *J Gastroenterol.* 2011 Sep 21. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21935635.
- 7)Takata A, Otsuka M, Kogiso T, Kojima K, Yoshikawa T, Tateishi R, Kato N, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. Direct differentiation of hepatic cells from human induced pluripotent stem cells using a limited number of cytokines. *Hepatol Int* 2011 Feb 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21484132.
- 8)Arano T, Nakagawa H, Tateishi R, Ikeda H, Uchino K, Enooku K, Goto E, Masuzaki R, Asaoka Y, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Omata M, Yoshida H, Koike K. Serum level of adiponectin and the risk of liver cancer development in chronic hepatitis C patients. *Int J Cancer* 2010 Dec 17. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21170963.
- 9)Goto T, Yoshida H, Tateishi R, Enooku K, Goto E, Sato T, Ohki T, Masuzaki R, Imamura J, Shiina S, Koike K, Omata M. Influence of serum HBV DNA load on recurrence of hepatocellular carcinoma after treatment with percutaneous radiofrequency ablation. *Hepatol Int* 2011 Sep;5(3):767-773.
- 10)Taguwa S, Kambara H, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Koike K, Moriishi K, Matsuura Y. Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. *J Virol* 2011;85:13185-13194.
- 11)Kudo Y, Tanaka Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Mohri D, Isomura Y, Seto M, Nakagawa H, Asaoka Y, Tada M, Ohta M, Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Ikenoue T, Maeda S, Shiina S, Yoshida H, Nakajima O, Kanai F, Omata M, Koike K. Altered composition of fatty acids exacerbates hepatotumorigenesis during activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Hepatol* 2011;55(6):1400-1408.
- 12)Ishizaka N, Hongo M, Sakamoto A, Saito K, Furuta K, Koike K. Liver lipid content is reduced in rat given 7-day administration of

- angiotensin II. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2011;12(4):462-468.
- 13) Bertot LC, Sato M, Tateishi R, Yoshida H, Koike K. Mortality and complication rates of percutaneous ablative techniques for the treatment of liver tumors: a systematic review. *Eur Radiol* 2011;21(12):2584-2596.
- 14) Yamashiki N, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Yoshida H, Aoki T, Hasegawa K, Akahane M, Ohtomo K, Fukayama M, Koike K, Kokudo N. Diagnostic accuracy of α -fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin in screening for hepatocellular carcinoma in liver transplant candidates. *Hepatol Res* 2011;41(12):1199-1207.
- 15) Fujinaga H, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Moriya K, Koike K. Hepatocarcinogenesis in hepatitis C: HCV shrewdly exacerbates oxidative stress by modulating both production and scavenging of reactive oxygen species. *Oncology* 2011;81 Suppl 1:11-7.
- 16) Ikeda H, Tateishi R, Enooku K, Yoshida H, Nakagawa H, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Kume Y, Tomiya T, Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Ono T, Koike K, Yatomi Y. Prediction of hepatocellular carcinoma development by plasma ADAMTS13 in chronic hepatitis B and C. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20(10):2204-2211. (2010IF 4.1)
- 17) Watanabe S, Enomoto N, Koike K, Izumi N, Takikawa H, Hashimoto E, Moriyasu F, Kumada H, Imawari M; PERFECT Study Group. Cancer preventive effect of pegylated interferon α -2b plus ribavirin in a real-life clinical setting in Japan: PERFECT interim analysis. *Hepatol Res* 2011;41(10):955-964.
- 18) Otsuka M, Takata A, Yoshikawa T, Kojima K, Kishikawa T, Shibata C, Takekawa M, Yoshida H, Omata M, Koike K. Receptor for Activated Protein Kinase C: Requirement for Efficient MicroRNA Function and Reduced Expression in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One*. 2011;6(9):e24359. Epub 2011 Sep 15. PubMed PMID: 21935400.
- 19) Uchino K, Tateishi R, Shiina S, Kanda M, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Omata M, Yoshida H, Koike K. Hepatocellular carcinoma with extrahepatic metastasis: Clinical features and prognostic factors. *Cancer* 2011;117(19):4475-4483.
- 20) Takata A, Otsuka M, Kojima K, Yoshikawa T, Kishikawa T, Yoshida H, Koike K. MicroRNA-22 and microRNA-140 suppress NF- κ B activity by regulating the expression of NF- κ B coactivators. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;411(4):826-831.
- 21) Wakita T, Suzuki T, Evans MJ, Shimotohno K, Chayama K, Matsuura Y, Hijikata M, Moriishi K, Seya T, Enomoto N, Koike K, Kato N, Kanto T, Hotta H. Will There Be an HCV Meeting in 2020? Summary of the 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. *Gastroenterology* 2011 Jul;141(1):e1-5.
- 22) Nakagawa H, Hirata Y, Takeda K, Hayakawa Y, Sato T, Kinoshita H, Sakamoto K, Nakata W, Hikiba Y, Omata M, Yoshida H, Koike K, Ichijo H, Maeda S. Apoptosis signal-regulating kinase 1 inhibits hepatocarcinogenesis by controlling the tumor-suppressing function of stress-activated MAPK. *Hepatology* 2011;54(1):185-195.
- 23) Kojima K, Takata A, Vadnais C, Otsuka M, Yoshikawa T, Akanuma M, Kondo Y, Kang YJ, Kishikawa T, Kato N, Xie Z, Zhang WJ, Yoshida H, Omata M, Nepveu A, Koike K. MicroRNA122 is a key regulator of α -fetoprotein expression and biologically aggressive behavior of hepatocellular carcinoma. *Nat Commun* 2011 Jun 7;2:338. doi: 10.1038/ncomms1345. PubMed PMID: 21654638. (on-line journal)
- 24) Tsukada K, Sugawara Y, Kaneko J, Tamura S, Tachikawa N, Morisawa Y, Okugawa S, Kikuchi Y, Oka S, Kimura S, Yatomi Y, Makuuchi M, Kokudo N, Koike K. Living donor liver transplantations in HIV- and hepatitis C virus-coinfected hemophiliacs: Experience in a Single Center. *Transplantation* 2011;91(11):1261-1264.
- 25) Koshiyama A, Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Yazawa I, Imai K. Liquid chromatographic separation of proteins derivatized with a fluorogenic reagent at cysteinyl residues on a non-porous column for differential proteomics analysis. *J Chromatogr A* 2011;1218(22):3447-3452.
- 26) Kumar V, Kato N, Urabe Y, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R,

- Omata M, Nakagawa H, Koike K, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2011;43(5):455-458.
- 27) Nakagawa H, Ikeda H, Nakamura K, Ohkawa R, Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Watanabe N, Tejima K, Kume Y, Iwai T, Suzuki A, Tomiya T, Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Omata M, Igarashi K, Aoki J, Koike K, Yatomi Y. Autotaxin as a novel serum marker of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2011;412(13-14):1201-1206.
- 28) Kershenobich K, Razavi HA, Cooper CL, Alberti A, Dusheiko GM, Pol S, Zuckerman E, Koike K, Han K-H, Wallace CM, Zeuzem S, Negro F. The global health burden of hepatitis C virus infection. *Liver Int* 31(S2):4-17, 2011.
- 29) Sievert W, Altraif I, Razavi HA, Abdo A, Ahmed EA, AlOmar A, Amarapurkar D, Chen C-H, Dou X, El Khayat H, elShazly M, Esmat G, Guan R, Han K-H, Koike K, Largen A, McCaughan G, Mogawer S, Monis A, Nawaz A, Piratvisuth T, Sanai FM, Sharara AI, Sibbel S, Sood A, Suh DJ, Wallace C, Young K, Negro F. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Asia, Australia and Egypt. *Liver Int* 31(S2):61-80, 2011.
- 30) Yasui K, Hashimoto E, Komorizono Y, Koike K, Arii S, Imai Y, Shima T, Kanbara Y, Saibara T, Mori T, Kawata S, Uto H, Takami S, Sumida Y, Takamura T, Kawanaka M, Okanoue T; The Japan NASH Study Group, The Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;9(5):428-433. (2009; 5.642)
- 31) Koike K, Miyoshi H, Yotsyanagi H, Moriya K. Effect of treatment with polyunsaturated fatty acids on HCV-or diet-induced fatty liver. *J Hepatol* 2011;54:1326.
- 32) Masuzaki R, Shiina S, Tateishi R, Yoshida H, Goto E, Sugioka Y, Kondo Y, Goto T, Ikeda H, Omata M, Koike K. Utility of contrast enhanced ultrasonography with sonazoid in radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26(4):759-764.
- 33) Miyoshi H, Moriya K, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Fujinaga H, Goto K, Todoroki T, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y, Yotsyanagi H, Koike K. Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: polyunsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core protein. *J Hepatol* 2011;54:432-438.
- 34) Kondo Y, Shiina S, Tateishi R, Arano T, Uchino K, Enooku K, Goto E, Nakagawa H, Masuzaki R, Asaoka Y, Fujie H, Goto T, Omata M, Yoshida H, Koike K. Intrahepatic bile duct dilatation after percutaneous radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: impact on patient's prognosis. *Liver Int* 2011;31:197-205.

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

「肝細胞癌発生予測因子としての血中 ADAMTS13」 知的財産管理番号 12B10Y001-1 出願日 平成22年11月5日 発明者 池田均、矢富裕、建石良介、小池和彦、小野智子

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし